Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Lehrstuhl I
der Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. S. Hollmann

DER EINFLUSS VON KALZIUM AUF DIE FRÜHE PHASE DER CCl_4 – INTOXIKATION

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät zu Düsseldorf vorgelegt

von

FRIEDHELM REUTER
aus Düsseldorf

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0006

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Lehrstuhl I
der Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. S. Hollmann

DER EINFLUSS VON KALZIUM AUF DIE FRÜHE PHASE DER CCl_4 – INTOXIKATION

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät zu Düsseldorf vorgelegt

von

FRIEDHELM REUTER
aus Düsseldorf

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

"Gedruckt mit Genehmigung der med. Fakultät der Universität Düsseldorf"

der Dekan
der medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Sraßburg

der Referent
gez. Prof. Dr. Hollmann

der Koreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Chemikalien	
2.2.	Vorbehandlung von Glasgeräten	
2.3.	Tiere	
2.4.	Entnahme von Blut und Leber	4
2.5.	Spülung der Leber	5
2.6.	Kalziumbestimmung	6
2.6.1.	Veraschung	
2.6.2.	Messung im Atomabsorptionsphotometer	
2.7.	Bestimmung des CCl_4-Gehaltes der Leber	8
2.8.	Mikrosomenpräparation	9
2.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration	10
2.10.	Bestimmung der Cytochrom P-450-Konzentration	11
2.10.1.	Bestimmung im Gesamthomogenat	
2.10.2.	Bestimmung in der Mikrosomenfraktion	12
2.11.	Bestimmung der Aktivität der Glukose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9)	
2.12.	Bestimmung des in vitro Einbaus von 1-^{14}C-Leucin in die mikrosomalen Proteine	13
2.13.	Statistischer Test	15

3.	Ergebnisse und Diskussion	16
3.1.	Auswirkungen der Leberperfusion auf den intrahepatischen Kalziumgehalt	
3.1.1.	Vergleich unterschiedlicher Perfusionsmethoden	
3.1.2.	Einfluß der retrograden Perfusion mit Saccarose/Tris-Lösung auf den Leberkalziumgehalt von unbehandelten und mit CCl_4 behandelten Tieren	18
3.2.	Zeit-und Dosisabhängigkeit der intrahepatischen Kalziumkonzentration nach CCl_4-Intoxikation	21
3.3.	Einfluß von Kalziumglukonat auf frühe Effekte der CCl_4-Vergiftung	26
3.3.1.	Einfluß auf die Schädigung des Cytochrom P-450	
3.3.2.	Einfluß auf die Schädigung der Glukose-6-Phosphatase	29
3.3.3.	Einfluß auf die Schädigung der Aminosäureinkorporation der Mikrosomen	31
4.	Zusammenfassung	35
5.	Literaturverzeichnis	37

EINLEITUNG

Gegen Ende des vorigen Jahrhunderts war bereits bekannt, daß Tetrachlorkohlenstoff, CCl_4, beim Menschen Leberschäden verursacht (s. Wells, 1925). CCl_4 bedingt unter anderem zeitliche Änderungen des Kalziumgehaltes der Leber, die bei anderen Haloalkanen nicht beobachtet wurden. Nach ca. 1 Stunde erreicht die intrahepatische Kalziumkonzentration ein erstes Maximum und nach 2 Stunden wieder den Normalwert (Reynolds, 1963). Während dieser Zeit sind Effekte der CCl_4-Intoxikation am endoplasmatischen Retikulum feststellbar. Der Kalziumgehalt und das Kalziumbindungsvermögen der Mikrosomen (Reynolds, 1972; Moore, 1976), als isoliertes endoplasmatisches Retikulum, sowie der der Polysomen, als Ort der Proteinsynthese (Smuckler, 1966), nimmt ab. Elektronenmikroskopisch ist eine Anschwellung des endoplasmatischen Retikulums mit Ablösung der Ribosomen sichtbar (Reynolds, 1963). Die Proteinsynthese ist gehemmt (Smuckler und Benditt, 1965). Darüberhinaus wird die Aktivität bzw. Konzentration endoplasmatischer Enzyme, speziell die der Glukose-6-Phosphatase und des Cytochrom P-450 vermindert. Der Mechanismus dieser Veränderungen ist bis heute ungeklärt. Es stellt sich die Frage, ob der CCl_4-bedingte Kalziumeinstrom den oben beschriebenen Effekten entgegenwirkt oder, wie im Falle der Entkopplung der mitochondrialen oxydativen Phosphorylierung (Reynolds, 1962) einen schädigenden Einfluß besitzt. Schutzfunktionen eines erhöhten Leberkalziumgehaltes sind in der Literatur beschrieben, so beobachteten bereits Minot und Cutler (1929), daß eine kalziumarme Diät eine verminderte Toleranz gegenüber CCl_4 bewirkt, wogegen sich die therapeutische intravenöse Injektion von Kalziumchlorid günstig auswirkte. Cantarow (1938) konnte durch intravenöse

Injektion von Kalziumglukonat die CCl_4-bedingte Letalität um 50 % senken und außerdem über eine histologisch weniger ausgeprägte Leberschädigung berichten. Wie die gleichzeitige Applikation von CCl_4 und Kalziumglukonat führt auch die Vorbehandlung von Tieren mit Vitamin D zu einem ähnlich hohen Kalziumeinstrom nach CCl_4-Applikation (Kröner, 1977). Vitamin D -Vorbehandlung führt zu geringerer Schädigung des Cytochrom P-450 (Fander, 1979), zu einem geringeren Austritt der Alanintransaminase ins Serum (Kröner, 1977) und einer verminderten Leberverfettung (Haas, persönliche Mitteilungen).

In Abgrenzung zu der Vitamin D bedingten Kalziumerhöhung in der Leber wird in der vorliegenden Arbeit in vivo der Einfluß einer durch intraperitoneale Injektion von Kalziumglukonat erhöhten intrahepatischen Kalziumkonzentration auf frühe Effekte der CCl_4-Vergiftung untersucht, nämlich Schädigung des Cytochrom P-450 und der Glukose-6-Phosphatase sowie Hemmung der Proteinsynthese.

MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Tetrachlorkohlenstoff, Kalziumglukonat und Tris(hydroxymethyl) - aminomethan, Tris, wurden von Merck, Darmstadt, $^{14}CCl_4$ (6,94 Ci/Mol) und L (1-^{14}C) Leucin (50 Ci/Mol) von Radiochemical Centre, Amersham (England), Moni-trol I - Kontrollserum von Merz & Dade, München, Serumalbumin vom Rind von den Behringwerken, Marburg, ATP-Na_2 (enz. Reinheitsgrad 82%), GTP-Na_3 (enz. Reinheitsgrad 70%), PEP-K (enz. Reinheitsgrad 97%), Glukose-6-Phosphat (enz. Reinheitsgrad 77%) und Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40 /200 U/mg) von Boehringer, Mannheim und Soluene-350 von Packard, Zürich, bezogen. Renex 690 war ein Geschenk der Atlas Chemie, Essen. Natriumglukonat wurde aus einer Kalziumglukonatlösung über einen Natrium beladenen Kationenaustauscher (Dowex 50x8) und anschließender Gefriertrocknung gewonnen. Alle anderen Chemikalien wurden in der handelsüblichen Form mit höchstem Reinheitsgrad bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

2. Vorbehandlung der Glasgeräte

Alle im Rahmen der Kalziumbestimmungen benutzten Glasgeräte wurden vor Gebrauch zweimal mit Aqua bidest. gespült, dann mit 1%iger Salzsäure gefüllt und über Nacht stehengelassen. Anschließend wurde die Salzsäure abgegossen und zweimal mit Aqua bidest. gespült.

3. Behandlung der Tiere

Versuchstiere waren weibliche Wistarratten, 140 bis 225 g schwer, aus eigener Zucht. Die Tiere erhielten das Standardfutter 1310 der Firma Altromin (Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

24 Stunden vor der Tötung wurde den Tieren das Futter entzogen.

Tetrachlorkohlenstoff wurde in einer toxischen Dosierung von 1 ml (10,36 mMol) bzw. 2,5 ml (25,90 mMol) pro kg Körpergewicht, in Olivenöl gelöst, 60, 120 oder 180 Minuten vor der Entnahme der Leber unter leichter Äthernarkose intraperitoneal appliziert. Dabei betrug das Mischungsverhältnis von CCl_4 zu Olivenöl 1 : 10. Das applizierte Volumen betrug 1 bzw. 2,5ml/100 g Körpergewicht. Kontrolltiere erhielten 10%ige Natriumglukonatlösung in gleicher Dosierung. Die Lösung enthielt, atomabsorptiometrisch bestimmt, weniger als 1 µMol Kalzium (0,04% des Natriums) pro Milliliter. Zur Bestimmung des CCl_4-Gehaltes in der Leber enthielten 10 ml der CCl_4-Lösung 15,6 µMol (108,3 µCi) $^{14}CCl_4$.

2.4. Entnahme von Blut und Leber

Den Ratten wurde ein bzw. zwei Stunden nach Applikation des CCl_4 unter Äthernarkose die Bauchhöhle geöffnet. Es wurde die Aorta von der Bifurkation her mit einer 1-er Kanüle und einer 5ml Recordspritze punktiert und ca. 3 ml Blut entnommen. Mit einer Gefäßklemme wurde das Ausbluten der Tiere verhindert. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde über den rechten Vorhof des Herzens eine Braunüle G 18 (Braun, Melsungen) in die Vena cava inferior bis oberhalb der Leber vorgeschoben. Die untere Hohlvene wurde anschließend zwischen Niere und Leber abgebunden und die Pfortader durchtrennt. Dann wurde die Leber in situ mit 20, 50 oder 100 ml eisgekühlter Saccarose/Tris-Lösung (0,25 M Saccarose / 0,05 M Tris, pH 7,4) unter leichter Massage mit einem Druck von 40 cm Wassersäule perfundiert. Daraufhin wurde die Leber exzidiert, in Saccarose/Tris-Lösung gewaschen, zwischen zwei Lagen Filterpapier äußerlich getrocknet, gewogen, mit einer

Schere zerkleinert und in einen ca. 35 ml fassenden Teflon-Glas-Homogenisator (Potter -Elvehjem, die Toleranz zwischen Glasgefäß und Teflonstemper betrug 0,3 mm) überführt. Nach Zugabe der sechsfachen Menge (v/w) isotonischer (0,154 M) KCl-Lösung wurde bei 700 Upm durch ca. fünfundzwanzigmaliges Auf- und Abführen des Stempels 2 Minuten homogenisiert. Das Homogenat wurde dann zur Veraschung eingesetzt.

2.5. Spülung der Leber

In den oben beschriebenen Verfahren wurde die Leber retrograd (d.h. von der Vena cava inferior her) mit 20, 50 oder 100 ml Saccarose/Tris-Lösung gespült und als ganzes Organ entnommen. Abweichend von diesem Verfahren wurden bei einigen Versuchen neben Saccarose/Tris-Lösung auch andere Spüllösungen benutzt; dieses waren: KCl-/Tris-Lösung (0,1o4 M KCl / 0,05 M Tris, pH 7,4) und NaCl/Tris-Lösung (0,104 M NaCl / 0,05 M Tris, pH 7,4). Bei diesen Experimenten wurde die Leber nicht als ganzes Organ, sondern portionsweise (300 bis 500 mg) entnommen. Die erste Leberprobe wurde jeweils vor Beginn der Spülung entnommen, eine weitere nach Spülung mit 20 ml, eine weitere nach Spülung mit insgesamt 50 ml und eine letzte nach Spülung mit insgesamt 100 ml Spüllösung.

Im Gegensatz zur retrograden Spültechnik wurden die Lebern einiger Tiere über die Vena porta gespült. Hierzu wurde die Pfortader mit einer 1-er Kanüle, die über ein Stück Infusionsschlauch mit einer 100 ml Spritze verbunden war, punktiert und die Vena cava am oberen Leberpol durchtrennt. Auch in diesem Fall wurden, wie oben beschrieben, Leberstückchen nach unterschiedlichen Spülvolumina entnommen. Die Leberstückchen wurden geteilt, gewogen und als Zweifachbestimmung direkt zur Veraschung eingesetzt.

.6. Kalziumbestimmung

.6.1. Veraschung

Die Veraschung der Proben wurde in Anlehnung an die von Burck (1961) beschriebene Methode in 25 ml fassenden Veraschungskölbchen aus Duranglas 50 durchgeführt. Es wurden abzentrifugiertes Serum, Leberhomogenat oder Leberstückchen nach dieser Methode verascht. Zur Veraschung eingesetzt wurden jeweils in Doppelbestimmungen: 0,5 ml Serum, je nach zu erwartendem Ca^{2+}-Gehalt, 1,0 bis 2,5 ml Leberhomogenat bzw. Leberstückchen von 150 bis 350 mg. Zu den Proben gaben wir zur Vermeidung von Siedeverzügen je zwei Teflonstückchen, dann je 2 ml konzentrierte Schwefelsäure und 5 ml konzentrierte Salpetersäure. Anschließend wurden die Proben in Veraschungsblöcken während ca. 8 Stunden auf 240 bis 260°C erhitzt und bei dieser Temperatur ca. eine Stunde eingeengt. Nach Abkühlung wurde je Kölbchen 1 ml 30%iges wässriges H_2O_2 hinzupipettiert und die Kölbchen erneut auf 240 bis 260°C erhitzt. Daraufhin wurden die Proben zum Ausgleich von Ionisationsinterferenzen bei der Messung im Atom-Absorptions-Spektrometer mit je 0,5 ml 25%iger NaCl-Lösung versetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 25 ml gebracht. Die Veraschungskölbchen wurden dann mit Parafilm verschlossen, geschüttelt und der Messung im Atom-Absorptions-Spektrometer zugeführt. Zur Qualitätskontrolle wurden pro Messreihe zwei Kölbchen mit je 0,5 ml Kontrollserum und als Nullwert zwei Kölbchen mit je 0,5 ml Saccarose/Tris- und 0,5 ml KCl/Tris-Lösung mitverascht.

.6.2. Messung des Kalziumgehaltes im AAS

Die Bestimmung des Kalziumgehaltes der veraschten Proben erfolgte mit einem Atom-Absorptions-Spektrometer, Modell 300, der Firma Perkin-Elmer (Überlingen) in der Acetylen-Lachgas-

Flamme. Die Acetylen-Lachgas-Flamme hat gegenüber der Acetylen-Luft-Flamme den Vorteil einer größeren Empfindlichkeit (0,05 µg Ca^{2+}/ml / 1% Absorption gegenüber 0,07 µg Ca^{2+}/ml / 1% Absorption) und einer geringeren Störanfälligkeit gegenüber chemischen Interferenzen. Zur Aufnahme der Eichkurve wurden aus einer in Polypropylenflaschen aufbewahrten Stammlösung (20 mM an Ca^{2+}) sieben Standardlösungen mit Kalziumgehalten von 0,01 bis 0,09 mM angesetzt. Die Standards waren in Glasgefäßen einen Tag haltbar. Die Eichstandards enthielten wie die Proben H_2SO_4 in einer Konzentration von 0,085 M. Ebenso wurde ein Nullstandard angesetzt. Die Eichkurve war zwischen 0 und 3,5 µg Ca^{2+}/ml (≙ Extinktionen von 0 bis 0,25) linear. Die Proben wurden gegen einen Eichstandard mit einem Kalziumgehalt von 0,05 mM in der Reihenfolge Eichstandard, Nullstandard, Probe, Eichstandard, Nullstandard, nächste Probe, etc. gemessen. Dieses Verfahren zeigte im Vergleich mit zeitlich aufwendigeren Methoden, wie Additionsverfahren und Messung mit innerem Standard eine gute Übereinstimmung. So wurden z.B. für die Messung mit innerem Standard die Proben in zwei Teile geteilt und einem Probenteil eine definierte Menge Eichstandard zugefügt. Auf 5 ml Probenlösung (≙ 0,1 - 0,3 µMol Ca^{2+}) wurden dabei 100 µl eines Eichstandards (≙ 0,2 µMol Ca^{2+}) pipettiert. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Probe plus Standard, die einer bekannten Konzentration entsprach, konnte dann die Konzentration in der Probe berechnet werden. Die Ergebnisse der einzelnen Verfahren unterschieden sich um nicht mehr als 5%. Diese Übereinstimmung zeigt, daß Matrixinterferenzen bei der von uns verwendeten Methode vernachlässigt werden können.

Der optimale Messbereich des Gerätes liegt lt. Herstellerfirma zwischen Extinktionen von 0,1 und 0,5. Dieser Bereich wird durch den linearen Arbeitsbereich auf Extinktionen von 0,1 bis 0,25

eingeengt. Wir mußten diesen Bereich zum Teil unterschreiten, da auch bei niedrigen Kalziumkonzentrationen die zur Veraschung eingesetzte Probenmenge durch die Veraschungsmethode limitiert wurde. Zweckmäßig und wenig störanfällig erwies sich die Bestim im veraschten Leberhomogenat (Variationskoeffizient (VK)≤ 3% in Vierfachbestimmungen). Die Bestimmung in veraschten Leberstückchen ergab weniger reproduzierbare Ergebnisse (VK≤ 6%). Die Bestimmung im Serum konnte im optimalen Messbereich durchgeführt werden (VK≤ 2%).

2.7. Bestimmung des CCl_4-Gehaltes der Leber

Weibliche Wistarratten bekamen CCl_4 in einer Dosis von 1 ml pro kg Körpergewicht, 1 : 10 in Olivenöl gelöst, intraperitonea appliziert. 1ml CCl_4 enthielt 15,6 µMol $^{14}CCl_4$. Eine Stunde nach Applikation wurde die Leber mit 20 ml Saccarose/Tris-Lösung retrograd gespült, exzidiert und 0,7 bis 0,9 g des Lobus sinister abgetrennt. Während die übrige Leber homogenisiert, dann der Veraschung und der Bestimmung des Ca^{2+}- Gehaltes zugeführt wurde, wogen wir das abgetrennte und äußerlich zwischen zwei Lagen Filterpapier getrocknete Stückchen und zerkleinerten es mit einer Schere. Dieser Leberbrei wurde dann im 20-fachen Volumen (v/w) gekühlter Toluol/Methanol-Lösung (1:1) aufgenomme und im Dispersionsgerät Typ X 10/20 (Int.lab.-App., Dottingen) 3 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenat zentrifugierten wir 5 Minuten lang bei 1600 g (3000 Uqm) in verschließbaren Zentrifugenröhrchen mit einer Laborzentrifuge (Christ: Universa Junior III). Vom klaren Überstand wurden 3 mal 3 ml mit je 10 ml Diotol in luftdichtverschließbaren Kunststoff-Szintillationsgefäßen versetzt. Diotol ist ein Szintillatorsystem mit folgend Zusammensetzung: 500 ml Toluol, 500 ml Doxan, 300 ml Methanol,

104 g Naphthalin, 6,5 g PPO (2,5 Diphenyloxazol) und 130 ml POPOP (2,2'- p-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol). Nach Abklingen der Chemoluminenszenz wurde die Aktivität im Szintillationszähler Tricarb 3388 (Packard, Zürich) gemessen. Der CCl_4-Gehalt wurde in mMol CCl_4/kg Leber angegeben.

8. Mikrosomenpräparation

Die Leber der Ratten wurde, wie oben beschrieben, mit 20 ml eisgekühlter Saccarose/Tris-Lösung (0,25 M/ 0,05 M, pH 7,4) retrograd gespült, entnommen und in Saccarose/Tris-Lösung gewaschen. Sie wurde zwischen zwei Lagen Filterpapier getrocknet, gewogen, mit der Schere zerkleinert und im Teflon-Glas-Homogenisator (35 ml) im sechsfachen Volumen (v/w) Saccarose/Tris-Lösung aufgenommen und unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde dann 10 min in einer Kühlzentrifuge (Sorvall, RC 2-B) bei 755 g (2500 Upm, Rotor SS 34) zentrifugiert um Zellkerne, grobe Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu sedimentieren. Anschließend wurden aus dem Überstand in der selben Zentrifuge (20 min bei 14500 g, 11000 Upm, Rotor SS 34) die Mitochondrien sedimentiert. Der Überstand wurde abgehebert, auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Spinco L 2) während 60 min bei 105000 g (40000 Upm, Rotor 50 Ti) die Mikrosomen als Sediment gewonnen. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Sediment mit Saccarose/Tris-Lösung überspült, der Überstand dekantiert und der Niederschlag des einen Röhrchens der Bestimmung des Leucineinbaus zugeführt, während das zweite Sediment bis zur Bestimmung von Cytochrom P-450 und Glukose-6- Phosphatase bei -20°C aufbewahrt wurde (maximal 2 Tage). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 0 - 4°C.

2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde in Anlehnung an Lowry et al. (1951) nach der folgenden Anleitung bestimmt:

Lösungen:

Lösung 1: 3,3 g Kaliumnatriumtartrat mit H_2O ad 100 ml lösen.

Lösung 2: 1,25 g Kupfersulfat-5-hydrat mit H_2O ad 100 ml lösen.

Lösung 3: 25 g Natriumcarbonat mit H_2O ad 1000 ml lösen.

Lösung A: 1 N NaOH

Lösung B: 1 ml Lösung 1
1 ml Lösung 2
mit Lösung 3 auf 100 ml verdünnen (einen Tag haltbar)

Lösung C: 22,73 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck , Darmstadt) mit H_2O auf 100 ml verdünnen.

Durchführung der Bestimmung:

In ein Reagenzglas pipettieren:

0,5 ml H_2O-verdünnte Mikrosomensuspension (ca. 0,05 g Protein/l)

0,5 ml Lösung A

4,0 ml Lösung B

sofort gründlich mischen,

10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen,

1,0 ml Lösung C

mischen, 30 min bei Zimmertemperatur stehen lassen.

Anschließend bei 691 nm gegen den Reagentienleerwert ablesen und mit einer unter Verwendung von Rinderserumalbumin aufgestellten Bezugskurve die Proteinkonzentration berechnen.

.0. Bestimmung der Cytochrom P450-Konzentration

Die Konzentration des Cytochrom P-450 wurde als Differenzspektrum im Trübungszusatz des Spektrophotometers ACTA III (Beckman, München) gemessen. Es wurden optisch ausgemessene (1,00 cm), verschließbare Halbmikroquarzküvetten verwendet. Cytochrom P-450 wurde in Anlehnung an Omura und Sato (1964) als Dithionit reduzierter CO-Komplex bestimmt. Der zur Berechnung verwendete molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{450-490}$ betrug 91 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}.

0.1. Bestimmung im Gesamthomogenat

Der Gehalt der Gesamtleber an Cytochrom P450 wurde gemessen, indem 1,5 ml Homogenat zunächst mit 7 ml isotonischer KCl/Tris-Lösung (104 mM/ 50 mM, pH 7,4) verdünnt wurden. Nach Zugabe von 85 µl einer 10% Renex 690-Lösung und Umrühren mit einem Glasstab wurde 3 min bei Raumtemperatur solubilisiert. Anschließend wurden die festen Lebergewebsanteile bei 900 g (2200 Upm) in einer Laborzentrifuge (Christ: Universal Junior III) abzentrifugiert, die Suspension mit wenigen Körnchen Natriumdithionit reduziert und auf die Küvetten verteilt. Das Sediment war frei von Cytochrom P-450. Nun wurde die Grundlinie von 500 bis 400 nm registriert, die Probenküvette 20 Sekunden mit CO begast und das Differenzspektrum zwischen dem reduzierten, nicht mit CO begasten Inhalt der Referenzküvette und dem Inhalt der Probenküvette von 400 bis 500 nm aufgenommen. Die Extinktionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm wurde unter Berücksichtigung der Grundlinie bestimmt und mittels des oben angegebenen extinktionskoeffizienten die Konzentration berechnet. Die Verunreinigung durch Hämoglobin, charakterisiert durch ein Maximum des Differenzspektrums bei 418 nm, war infolge der Spülung mit Saccarose nicht zu vermeiden. Die Extinktion bei 418 nm war in allen

Versuchsreihen annähernd gleich, so daß die Randabsorption des Hämoglobin-CO-Spektrums bei 450 nm für die relative Bestimmung der Cytochrom P-450-Konzentration nicht berücksicht werden mußte.

2.10.2. Bestimmung in der Mikrosomenfraktion

Das aus der Mikrosomenpräparation erhaltene Sediment wurde im zweifachen Volumen (v/w,bezogen auf das Feuchtgewicht der betreffenden Leber) isotonischer KCl/Iris-Lösung aufgenommen, in einem rund 15 ml fassenden Teflon-Glas-Homogenisator (Potter-Elvehjem, die Toleranz zwischen Glasgefäß und Teflonstempel betrug 0,10 mm) im Handbetrieb homogenisiert und nach erfolgter Proteinbestimmung so mit KCl/Tris-Lösung verdünnt, daß die Proteinkonzentration in der Mikrosomensuspension ca. 1,5 mg/ml betrug. Die Bestimmung wurde dann wie unter 2.1o.2. gegeben, ausgeführt. Die Verunreinigungen durch Hämoglobin und P-420, charakterisiert durch ein Maximum des Differenzspektrum bei 418 bzw. 420 nm, waren so gering, daß ihre Randabsorption bei 450 nm vernachlässigt werden konnten.

2.11. Bestimmung der Aktivität der Glukose-6-Phosphatase

Die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase in der Mikrosomenfraktion wurde mittels der in unserem Labor gängigen Methode (s. de Groot, 1979) in Anlehnung an Baginski et al. (1974) bestimm Die im Inkubationsmedium aufgenommenen Mikrosomen inkubierten wir 3 Minuten bei 37°C und ermittelten das von der Glukose-6-Phosphatase pro Zeiteinheit freigesetzte anorganische Phosphat als blauen Molybdat-Phosphat-Komplex bei 700 nm im Spektrophotmeter (Beckman DB -GT). Die Aktivität des Enzyms wird in U/g mikrosomales Protein angegeben.

2. Bestimmung des in vitro Einbaus von 1-^{14}C-Leucin in die mikrosomalen Proteine

Die mikrosomale Proteinsyntheserate bestimmten wir mit 1-^{14}C-Leucin in Anlehnung an die von Smuckler et al. (1968) beschriebene Methode. Das Mikrosomenpellet wurde so in Saccarose/Tris-Puffer (0,25 M/ 0,05 M, pH 7,4) aufgenommen, daß ein Proteingehalt der Mikrosomensuspension von ca. 10 mg/ml resultierte. In der Mikrosomensuspension und im 105000 g Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt. In Vorversuchen fanden wir in Übereinstimmung mit Richter (1965), daß die Einbaurate des Leucins dann nicht von der Überstandsmenge abhängt, wenn mehr als 2,0 mg Überstandsprotein eingesetzt werden. Zur Inkubation setzten wir 0,3 ml 105000 g Überstand (2,8 - 4,0 mg Protein) und 0,2 ml Mikrosomensuspension (1,5 - 2,1 mg Protein) ein. Unter diesen Bedingungen ist nach Richter (1965) die Leucineinbaurate der eingesetzten mikrosomalen Proteinmenge direkt proportional. Darüberhinaus wurden für die Experimente die folgenden Lösungen benötigt:

1) Inkubationspuffer:

1,0 mMol (203,31 mg) $MgCl_2$ $6H_2O$
2,5 mMol (186,40 mg) KCl
5,0 mMol (605,70 mg) Tris
in 30 ml H_2O lösen, mit 2 N KOH auf pH 7,4 einstellen.

2) Merkaptoäthanol:

10,0 mMol (0,7 ml) in 50 ml H_2O lösen.

3) 1-^{14}C-Leucin:

in einer Verdünnung von 4 µCi/ml

4) ATP regenerierendes System:

a) 30 µMol (18,16 mg) Na_2-ATP
300 µMol (61,83 mg) K-PEP
6 µMol (3,54 mg) Na_3-GTP
in Saccarose/Tris-Puffer (pH 12,5)
lösen, mit 2N KOH auf pH 7,4 einstellen
und mit Saccarose/Tris-Puffer (pH 7,4)
auf ein Volumen von 3 ml ergänzen.

b) Pyruvatkinase (2,0 mg/ml)

5) Perchlorsäure: 0,05 M

6) Perchlorsäure/Leucin-Lösung:

0,02 Mol (2,623 g) Leucin in 100 ml
0,5 M Perchlorsäure lösen.

Durchführung der Bestimmung:

in 10ml Zentrifugengläser pipettieren:

0,30 ml Lösung 1
0,05 ml Lösung 2
0,10 ml Lösung 3
0,10 ml Lösung 4a
0,02 ml Lösung 4b

mischen und in einem Schüttelbad (120/min) 5 min bei 37°C vorinkubieren

0,30 ml 105000 g Überstand
0,20 ml Mikrosomensuspension

Man inkubiert 15 min im Schüttelbad bei 37°C. Durch Zugabe von 2 ml $HClO_4$/Leucin-Lösung wird die Inkubation abgestoppt und freie Leucin ausgewaschen. Die Proben werden 10 min in einer Laborzentrifuge (Christ, Universal Junior III) bei 1600 g (3000 Upm) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dieser Waschvorgang wird

wiederholt. Dann wird der Niederschlag in 2 ml Perchlorsäure aufgenommen, 15 min bei 70°C im Wasserbad erhitzt, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehebert. Schließlich wird das Sediment noch einmal in 2 ml $HClO_4$ gewaschen. Der Niederschlag wird dann in 2 ml Soluene-350 über Nacht bei 60°C aufgelöst, in 10 ml Diotol aufgenommen und die Aktivität nach Abklingen der Chemolumineszens im Szintillationszähler Tricarb 3388 (Packard, Zürich) bestimmt. Die Zählausbeute wurde mit Hilfe einer Ölrot/Soluene-Quenchkurve mit abgestuften Mengen Ölrot, 1,5 ml Soluene-350 und 10 µl ^{14}C-Standard in 10 ml Diotol ermittelt.

Statistischer Test

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den arithmetischen Mittelwerten wurde mittels des Zwei-Stichproben-Testes nach Student überprüft. Das Signifikanzniveau p der Nullhypothese war geringer als 0,05. Für signifikante Unterschiede auf diesem Niveau wird in den Abbildungen das Symbol " p " angegeben. Im Text wird kein gesondertes Symbol verwandt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Auswirkungen der Leberperfusion auf den intrahepatischen Kalziumgehalt

3.1.1. Vergleich unterschiedlicher Perfusionsmethoden

Zur Konzentrationsbestimmung des Hämoproteins, Cytochrom P-450, ist es erforderlich,die Leber blutleer zu spülen, da Hämoglobin bei der spektralen Bestimmung interferiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde dazu bisher eine Perfusion der Leber in situ mit 30 bis 50 ml isotonischer KCl von der Vena cava her bevorzugt (de Groot, Diplomarbeit, 1979; Fander, Dissertation, 1979). Andere Autoren benutzten zur Perfusion über die Vena cava isotonische NaCl (Omura und Sato, 1964) oder isotonische Saccarose-Lösung (Reynolds, 1963). Kröner (1977) spülte die Leber über die Vena porta mit isotonischer Saccarose/Tris-Lösung. Um eine Methode zu finden, mit der sowohl der Gehalt der Leber an Cytochrom P-450 als auch der an Kalzium zu bestimmen ist, untersuchten wir zunächst den Einfluß der Perfusion mit unterschiedlichen Volumina der aufgeführten Medien auf den Kalziumgehalt der Normalleber. Sowohl die retrograde als auch die portale Perfusion mit Saccarose/Tris-Lösung führt bei 20 ml Perfusionsvolumen zu einem auch mit größeren Volumina nicht zu steigernden ca. 30 %igen Verlust des Leberkalziums (Abb. 1), wobei die größere Streuung der Werte bei der portalen Perfusionsmethode auf den gegenüber der retrogr den Spülung schlechter steuerbaren Perfusionsdruck zurückzuführ e sein dürfte.Nach Greenway und Stark (1971) beträgt der Blutgehal ca. 25% und die interstitielle Flüssigkeit ca. 12% des Lebergewichts. Damit entfallen auf die extrazelluläre Flüssigkeit ca. 0,5 mMol Kalzium pro Kg Leber von insgesamt ca. 1,0 mMol/Kg.

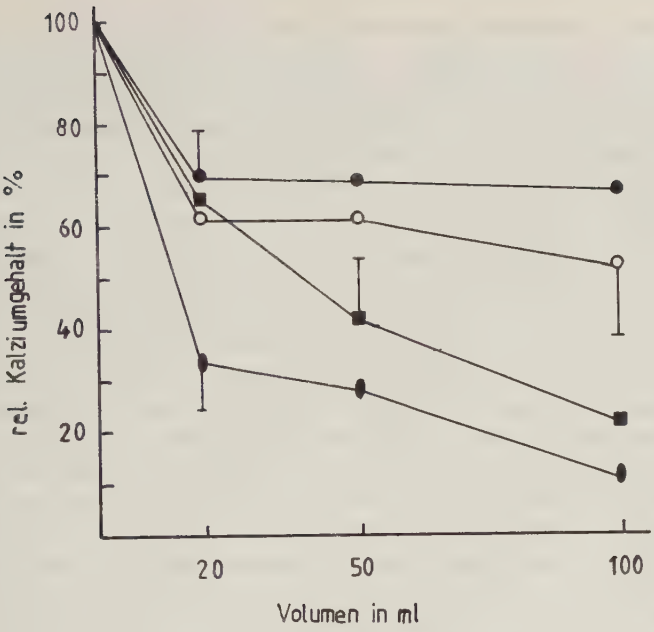

Abb. 1: Einfluß von Art und Volumen des Perfusionsmediums auf den Kalziumgehalt in Leberproben

Die Lebern von Normaltieren wurden mit Saccarose/Tris-Lösung ● , KCl/Tris-Lösung ■ oder NaCl/Tris-Lösung ⬮ von der Vena cava her mit einem Perfusionsdruck von 40 cm H_2O während ca. 3 min mit insgesamt 100 ml perfundiert.Analog wurden Lebern über die Vena porta mit Saccarose/Tris-Lösung perfundiert○.Vor der Perfusion und jeweils nach Perfusion mit 20, 50 und 100 ml wurde eine Leberprobe von ca. 300 mg entnommen,in der der Kalziumgehalt atomabsorptiometrisch bestimmt wurde. Der Kalziumgehalt vor Perfusion betrug ca. 1 mMol/Kg Leber. Mittelwerte aus jeweils 4 Proben $\pm$ Standardabweichung.

Die während der 2-3 Minuten dauernden Perfusion ausgespülten 30% des Leberkalziums stellen einen Teil des extrazellulären Kalziums dar, wogegen ein anderer Teil, wahrscheinlich durch Adsorption an Oberflächen, mit dieser Methode nicht zu entfernen war. Demgegenüber nimmt die Kalziumkonzentration in der Leber während der Perfusion mit KCl/Tris-Lösung oder NaCl/Tris-Lösung mit zunehmendem Perfusionsvolumen ab, ohne daß ein konstanter Wert erreicht wird (Abb. 1). Dies dürfte auf einem Austausch von Kalzium gegen Natrium bzw. Kalium zurückzuführen sein (Manery, 1969).In weiteren Experimenten bedienten wir uns der retrograden Perfusion mit Saccarose/Tris-Lösung, da hiermit bei ausreichender Entfernung des Hämoglobins ein reproduzierbarer Kalziumnachweis gegeben war.Die im Gegensatz zur Perfusion mit NaCl/Tris- und KCl/Tris-Lösung nicht vollständige Entfernung des Hämoglobins erwies sich als unerheblich, da der Hämoglobingehalt im Leberhomogenat relativ konstant war und in den Mikrosomen, bedingt durch die Zentrifugationsschritte, kein Hämoglobin mehr nachweisbar war.

1.2. Einfluß der retrograden Perfusion mit Saccarose/Tris-Lösung auf den Leberkalziumgehalt von unbehandelten und mit CCl_4 behandelten Tieren

Abweichend von den vorhergehenden Untersuchungen wird nun der Kalziumgehalt nach Perfusion der Leber mit unterschiedlichen Volumina (20-100 ml) Saccarose/Tris-Lösung nicht in Leberproben sondern jeweils im Homogenat der Gesamtleber von Normaltieren und mit CCl_4 behandelten Tieren bestimmt. Den Perfusionsdruck betreffende Ungenauigkeiten , dann, wenn bei der Entnahme einer Leberprobe ein größeres Gefäß eröffnet wurde,konnten hierdurch vermieden werden. Darüberhinaus erwies sich die atomabsorptiometrische Kalziumbe-

stimmung im veraschten Leberhomogenat unabhängig von der Perfusion gegenüber der Bestimmung in Leberproben als weniger störanfällig (s. Methodenteil). Die Ergebnisse des letzten Kapitels konnten wir mit dieser Methode bezüglich der Normaltiere bestätigen: durch Perfusion mit 20 ml Saccarose/Tris-Lösung werden ca. 25 % des Leberkalziums ausgespült, ohne daß dieser Wert mit größeren Volumina gesteigert werden könnte (Abb. 2). Bei den mit CCl_4 behandelten Tieren (1 ml CCl_4/Kg; 1 h) zeigte sich unabhängig vom Perfusionsvolumen ein konstanter, ca. 4-fach erhöhter Kalziumgehalt der perfundierten Leber gegenüber einem 5-fach erhöhten Kalzium in der nicht perfundierten Leber (Abb. 2). Die Abnahme beträgt relativ 30 % des Ausgangswertes und ist absolut fünfmal so hoch, wie der perfusionsbedingte Kalziumverlust der nicht geschädigten Leber. Der im Vergleich zu Normaltieren vermehrte perfusionsbedingte Kalziumverlust scheint zum Teil auf vermehrtes interstitielles Kalzium zurückzuführen sein.Eine Ausspülung von Kalzium aus CCl_4-geschädigten Leberzellen kann aufgrund von Schädigungen der Zellmembran nicht ausgeschlossen werden (Recknagel, 1967). Die Tatsache, daß sich auch bei mit CCl_4 behandelten Tieren mit dieser Perfusionsmethode ein konstanter Leberkalziumgehalt ergibt, gewährleistet einen reproduzierbaren, durch die Perfusion nicht wesentlich gestörten Kalziumnachweis. Die im Vergleich zu Normaltieren größeren Streuungen der Werte (Variationskoeffizienten bis zu ca. 25%) treten bereits bei ungespülten Lebern auf. Diese Streuungen sind, worauf auch Angaben in der Literatur deuten (Reynolds, 1965 a ; Kröner, 1977) primär nicht auf experimentelle sondern auf tierindividuelle Unterschiede zurückzuführen.

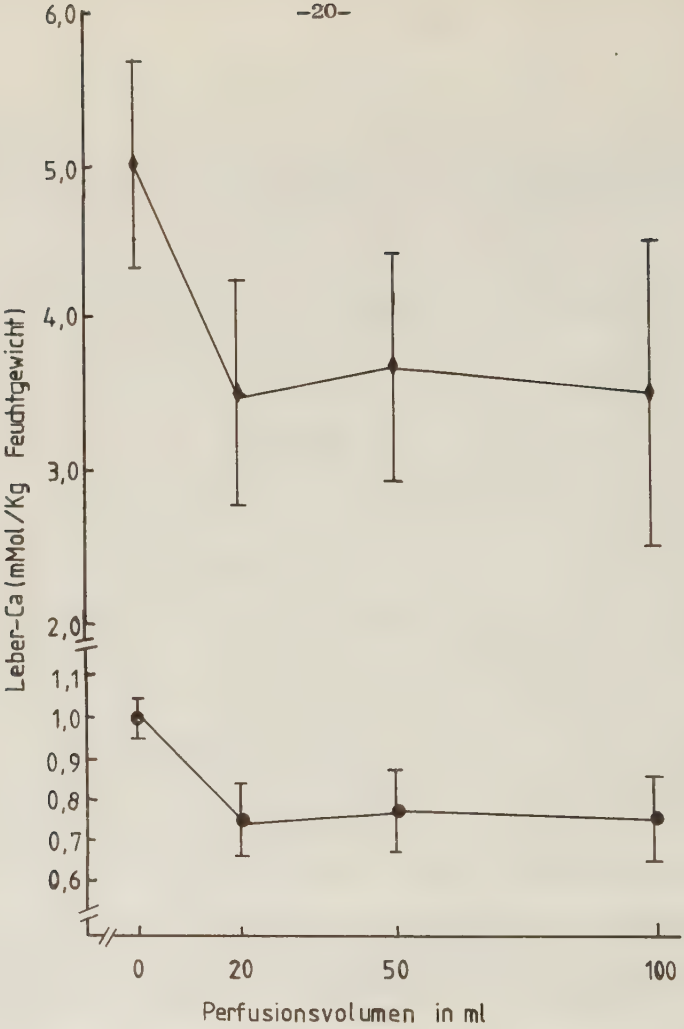

Abb. 2: Einfluß des Perfusionsvolumens auf den intrahepatische Kalziumgehalt von unbehandelten und mit CCl_4 behandelt weiblichen Ratten

Lebern von Normaltieren ● und CCl_4(1 ml/Kg Körpergew.; behandelten Tieren ♦ wurden mit 0, 20, 50 oder 100 ml Saccarose/Tris-Lösung perfundiert. Kalziumbestimmung i Leberhomogenat. Mittelwerte von 4 Tieren ± Standardab- weichung.

Zeit-und Dosisabhängigkeit der intrahepatischen Kalziumkonzentration nach CCl_4-Intoxikation

Bereits 3o Minuten nach der Applikation von Tetrachlorkohlenstoff fand Reynolds (1963) ein zweifach erhöhtes Leberkalzium, das am Ende der ersten Stunde mit vierfach erhöhten Werten maximal wird, während der zweiten Stunde wieder zur Normalkonzentration absinkt und nach der 8. Stunde erneut ansteigt,um ca. 4o Stunden nach der Applikation mit einer zwanzigfach erhöhten Konzentration ein zweites Maximum zu erreichen (Rees,1962 ; Reynolds, 1964). Nach 72 Stunden findet man dann wieder normale Kalziumkonzentrationen in der Leber. Diesem biphasischen Kalziumeinstrom entspricht eine unterschiedliche Verteilung des intrahepatischen Kalziums: während des ersten Konzentrationsmaximums findet man eine gleichmäßige Verteilung des Kalziums über das Leberläppchen, wogegen zur Zeit des zweiten Gipfels eine vorwiegend zentrilobuläre Anreicherung beobachtet wird (Reynolds 1964). Wir untersuchten die für später folgende Experimente grundlegenden Veränderungen der kalziumkonzentration in Leber und Serum im Vergleich zur CCl_4-Konzentration während der ersten drei Stunden nach intraperitonealer Applikation von 1ml CCl_4/Kg Körpergewicht. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur (Reynolds, 1963; Kröner, 1977) eine ca. vierfache Erhöhung des intrahepatischen Kalziumgehaltes nach einer Stunde (Abb.3).Smuckler (1966) fand zu diesem Zeitpunkt nur einen Anstieg von 5o % gegenüber Kontrolltieren. Dies ist auf die von Smuckler durchgeführte Perfusion der Leber mit physiologischer NaCl-Lösung, die vermehrt Kalzium ausschwemmt, zurückzuführen (s.o.). Zwei Stunden nach der Applikation beobachten wir eine immer noch vierfach erhöhte, nach drei Stunden aber in Normbereich abgesunkene Kalziumkonzentration in der Leber. Der Serumkalziumspiegel war während des untersuchten Zeitraums konstant.

Die Konzentration von CCl_4 in der Leber steigt bis zur ersten Stunde an und bleibt dann während des Untersuchungszeitraums konstant, so daß die Abnahme der Kalziumkonzentration nicht auf einem verminderten CCl_4-Gehalt der Leber beruht (Abb. 4).

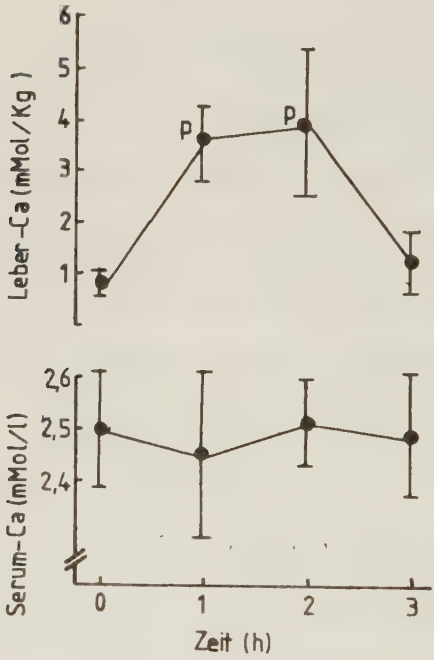

Abb. 3: Kalziumkonzentration in Serum und Leber. 0, 1, 2 und 3 Std. nach Applikation von 1 ml CCl_4/Kg Körpergewic (1:10 in Olivenöl)wurde weib lichen Ratten Blut aus der Aorta und die mit 20 ml Sacc rose/Tris-Lösung perfundiert Leber entnommen. Die Kalzium konzentrationen wurden atom- absorptiometrisch bestimmt. Mittelwerte von wenigstens 4 Tieren ± Standardabweichung. p : signifikant mit $p < 0,05$

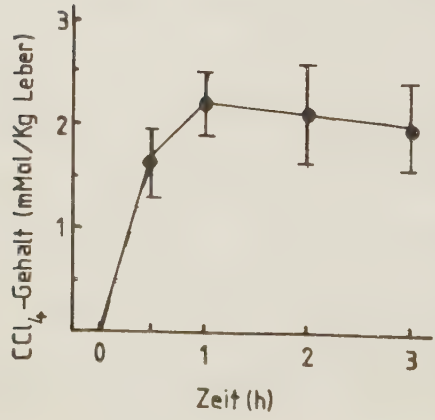

Abb.4: CCl_4-Konzentration in der Leber. Den Tieren wurde radioaktiv markiertes $^{14}CCl_4$ (1:10 in Olivenöl) in einer Dosis von 1ml/Kg i.p. appli- ziert. Nach Perfusion (Abb.3 wurde die Leber in Toluol/Me thanol (1/1) homogenisiert u zentrifugiert. Die Aktivität wurde im Überstand gemessen. Mittelwerte von 3 Tieren ± s

Vergleicht man Angaben aus der Literatur (Reynolds, 1965; Iröner, 1977) mit unseren Werten, so fällt auf, daß bei unterschiedlicher toxischer Dosierung (1-2,5 ml/Kg) und unterschiedlicher Applikation des CCl_4 (oral/intraperitoneal) ein gleich großer Kalziumeffekt resultiert. Eigene Experimente mit 1,0 bezw. 2,5 ml intraperitoneal appliziertem CCl_4 ($_1$: 10 in Olivenöl gelöst)bestätigen diese Beobachtung: der Kalziumgehalt der Leber ließ sich während der ersten Stunde nach der Applikation durch eine Erhöhung der CCl_4-Dosis nicht steigern (Abb. 5). Reynolds 1965 b) wies einen Kalziumeinstrom in die Leber bereits bei Dosierungen von weniger als 100 µl CCl_4/Kg Körpergewicht nach. Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen denen von Gerhard et. al. (1970), die die Beziehungen zwischen Dosis und Proteinsynthesehemmung sowie Dosis und läppchenzentraler Nekrose untersuchten.

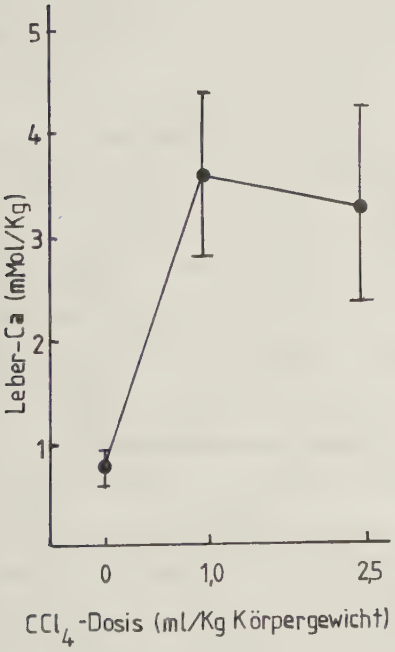

Abb. 5:
Abhängigkeit des intrahepatischen Kalziums von der CCl_4-Dosis. Die Leber wurde 1 Std. nach Applikation von 1,0 bzw. 2,5 ml CCl_4 (1 : 10 in Olivenöl) perfundiert (s.Abb. 3) und die Kalziumkonzentration im Leberhomogenat bestimmt.Mittelwerte von 6 Tieren ± Standardabweichung.

Eine Steigerung des CCl_4-bedingten Kalziumeinstroms kann durch Erhöhung des Kalziumangebotes erzielt werden (Kröner, 1977). Wir applizierten Normaltieren intraperitoneal 1 ml 10%iges Kalziumglukonat pro Kg Körpergewicht und konnten bereits Minuten nach der Applikation eine ca. dreifach erhöhte Serumkalziumkonzentration nachweisen, die über eine Stunde konstant blieb (Abb. 6), so daß über den Untersuchungszeitraum ein sicher ausreichendes Kalziumangebot gegeben ist. Diese erhöhte Konzentration wird auch durch CCl_4 nicht signifikant beeinflußt (Tab. I) . Der Leberkalziumgehalt mit Kalziumglukonat behandelter Tiere war gegenüber Vergleichstieren nach 15 Minuten verdoppelt und blieb ebenfalls während des untersuchten Zeitraums konstant (Abb.6). Demgegenüber zeigte sich bei gleichzeitg mit CCl_4 und Kalziumglukonat behandelten Tieren 1 Stunde nach der Applikation ein 20-fach erhöhter intrahepatischer Kalziumgehalt (Tab.I), wie er nach alleiniger Verabreichung von CCl_4 erst nach 40 Stunden zu erwarten ist (Rees, 1962;Reynolds 1964).

Bisher konnte die Bedeutung des frühen Kalziumeinstroms nicht geklärt werden. Ein Kalziumeinstrom ins Gewebe wird von einigen Autoren als ein frühes Zeichen des Zelluntergangs mit genereller Membranschädigung diskutiert (Majno, 1964; Judah, 1964;Recknagel, 1967). Eine Schädigung der Zellmembran als Ursache des erhöhten intrahepatischen Kalziums erscheint naheliegend. Auch der nur in CCl_4-geschädigten Lebern exzessive Einstrom infolge eines erhöhten Kalziumangebots spricht für eine solche Membranschädigung. Der Kalziumausstrom nach 2-3 Stunden kann jedoch mit einer solchen, zur Nekrose führenden Membranschädigung nicht erklärt werden. Reynolds (1964) beobachtete überdies in der frühen Phase eine gleichmäßige Verteilung des Kalziums über das Leberläppchen erst

nach acht bis zwölf Stunden konzentriert sich das erhöhte intrahepatische Kalzium auf die zentrilobulären Anteile der Leber, in denen letztlich, verbunden mit maximalen Kalziumkonzentrationen, die Nekrose manifest wird (Cameron, 1936; Reynolds, 1964; Gerhard, 1970; Smuckler, 1976). Der nach dem zweiten Maximum absinkende Kalziumgehalt korreliert zeitlich mit der Phagozytose abgestorbener Zellen (Reynolds, 1964). Offensichtlich handelt es sich bei den zwei Phasen des Kalziumanstiegs um unterschiedliche Phänomene.

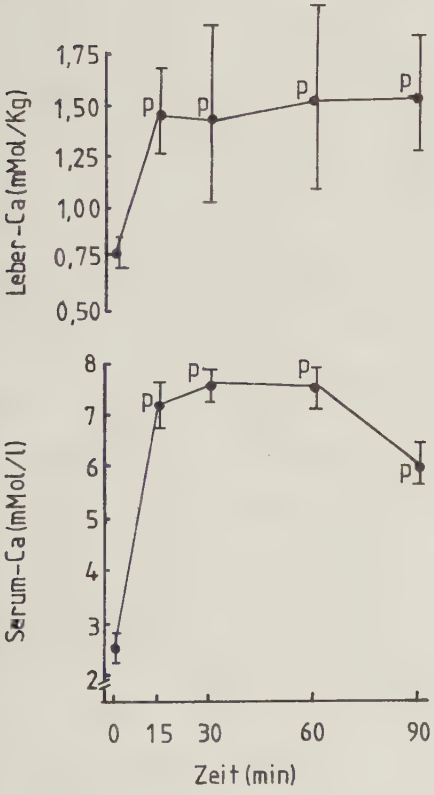

Abb. 6:
Kalziumspiegel in Leber und Serum 0, 15, 30, 60 und 90 min nach intraperitonealer Injektion von 1 ml Kalziumglukonat (10%ig) pro Kg Körpergewicht. Zur Perfusion der Leber und Bestimmung der Kalziumkonzentration siehe Abb. 3. Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. p : signifimit $p < 0{,}05$.

3.3. Einfluß von Kalziumglukonat auf frühe Effekte der CCl_4-Vergiftun

3.3.1. Einfluß auf die Schädigung des Cytochrom P-450

Es ist bekannt, daß CCl_4 durch das Fremdstoff-Monooxygenase-system an der Membran des endoplasmatischen Retikulums metabolisiert wird und dadurch seine toxische Potenz erwirbt (Recknagel 1973; Castro, 1972). Als ein wesentlicher Bestandteil dieses Systems wird das Cytochrom P-450 bereits während der ersten Stunde der CCl_4-Intoxikation geschädigt (Smuckler und Arrhenius 1967; Slater, 1969; Barker, 1969). Dies geht zeitlich mit dem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Anstieg des Leberkalziums und der elektronenmikroskopisch sichtbaren Aufblähung des endoplasmatischen Retikulums einher (Smuckler, 1961; Reynolds, 1963). Im folgenden wird der Einfluß eines durch i. p. Injektion von Kalziumglukonat erhöhten Leberkalziums auf die Schädigung des Cytochrom P-450 untersucht. Die Konzentration des Enzyms wurde dazu in den Mikrosomen und im Leberhomogenat bestimmt.

In den Mikrosomen ist die Konzentration des Cytochrom P-450 eine Stunde nach Gabe von CCl_4 signifikant um 30-40% vermindert (Tab.I). Die erhöhte Kalziumkonzentration in der Leber nach gleichzeitiger Applikation von Kalziumglukonat und CCl_4 zeigt in den Mikrosomen keinen signifikanten Unterschied der Enzymkonzentration gegenüber lediglich mit CCl_4 behandelten Tieren (Tab. I). Die alleinige Applikation von Kalziumglukonat bewirkt keine signifikante Veränderung der bei Normaltieren gefundenen Enzymkonzentration. Die Messung der Cytochrom P-450-Konzentration im Gesamthomogenat ergab eine Stunde nach Gabe von CCl_4, vergleichbar der Bestimmung in den Mikrosomen, eine ca. 40%ige Abnahme (Tab. I). Auch im Gesamthomogenat hatte die alleinige Applikation von Kalziumglukonat keinen Einfluß auf die Enzymkonzentration. Im Gegensatz zu den Befunden in der Mikrosomen-

fraktion ergab sich jedoch im Gesamthomogenat eine zusätzliche, ca. 20%ige Konzentrationsabnahme des Enzyms, wenn gleichzeitig mit dem CCl_4 Kalziumglukonat appliziert wurde (Tab. I). In weiteren Experimenten setzten wir dem Leberhomogenat von Normaltieren Kalziumchlorid zu. Dabei zeigte sich, daß eine 20-fach erhöhte Kalziumkonzentration des Homogenates zu einer ca. 20%igen Abnahme des Enzyms bei der Bestimmung im Gesamthomogenat, jedoch zu keiner signifikanten Abnahme in der Mikrosomenfraktion führte (Tab. II).

Tab.II: Einfluß unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen des Leberhomogenats auf die Konzentration von Cytochrom P-450 im Gesamthomogenat und den Mikrosomen. Lebern von Normaltieren wurden in zwei gleiche Portionen geteilt, gewogen und im 6-fachen Volumen (v/w) des jeweiligen kalziumhaltigen Homogenisationsmediums aufgenommen. Ein Aliquot des Homogenates wurde mit Renex 690 solubilisiert und nach Zentrifugieren die Enzymkonzentration im Überstand gemessen. Aus dem übrigen Homogenat wurden die Mikrosomen präpariert. Mittelwerte aus 3 Messungen ± Standardabweichung. Die Werte werden denen aus Versuchen mit kalziumfreiem Homogenisationsmedium gegenüber gestellt (n=4).

Homogenisations-medium	Kalzium im Homogenat (mMol/l)	P-450 Ges. Hom. (mMol/g Leber)	P-450 Mikrosomen (mMol/mg Prot.)
Sacc./Tris	0,11	24,95±3,3	0,68±0,06
Sacc./Tris (0,65 mM $CaCl_2$)	0,49	25,73±2,8	0,71±0,08
Sacc./Tris (2,2 mM $CaCl_2$)	2,06	19,80±1,8	0,65±0,05

Aus der Literatur ist bekannt, daß eine viermal höhere als die maximale von uns untersuchte Kalziumkonzentration im Leberhomogenat zwar zu einem veränderten Sedimentationsverhalten infolge einer Aggregation von Mikrosomen, nicht aber zu einer Schädigung des Cytochrom P-450 führt (Kamath, 1971/72; Schenkman, 1978). Falls es auch unter unseren Bedingungen zu einem veränderten Sedimentationsverhalten mit geringerer Mikrosomenausbeute kommt, wird dieser Fehler durch den Bezug der Enzymkonzentration auf die mikrosomale Proteinmenge korrigiert. Die Proteinkonzentrationen in den aus unterschiedlichen Homogenaten gewonnenen Mikrosomensuspensionen stimmten jedoch gut überein (1,64$\pm$0,17 mg/ml), sodaß ein wesentlich verändertes Sedimentationsverhalten während der Mikrosompräparation unwahrscheinlich ist. Im Gesamthomogenat kommt es unter der Voraussetzung, daß Kalzium nicht zu einer direkten Schädigung des Cytochrom P-450 führt, offensichtlich bei hohen Kalziumkonzentrationen zu einer Beeinträchtigung der Bestimmungsmethode. Aus den an Mikrosomen gewonnenen Ergebnissen schließen wir, daß die intrahepatische Kalziumerhöhung durch Kalziumglukonat keinen Einfluß auf die CCl_4-bedingte Schädigung des Cytochrom P-450 hat.

3.2. Einfluß auf die Schädigung der Glukose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9.)

Bereits wenige Minuten nach der Applikation von CCl_4 wird mit der Glukose-6-Phosphatase ein weiteres an die Membran des endoplasmatischen Retikulum gebundenes Enzym, das jedoch im Gegensatz zum Cytochrom P-450 kein Bestandteil des Fremdstoff-Monooxygenasesystems ist, geschädigt (Reynolds, 1963). Eine Stunde nach der in vivo Intoxikation konnten wir in Übereinstimmung mit der Literatur (Castro, 1972) eine ca. 50%ige Abnahme der Enzymaktivität nachweisen. Die Applikation von Kalziumglukonat hatte weder bei Vergleichstieren noch bei gleichzeitiger Gabe von CCl_4 einen signifikanten Einfluß auf die Aktivität des Enzyms (Tab. I). Recknagel (1967) zeigte bereits in vitro, daß die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase allein durch unterschiedliche Kalziumkonzentrationen nicht zu beeinflussen ist. Eine primäre Schädigung des Enzyms durch Kalzium ist im Falle der CCl_4-Vergiftung auch deshalb nicht zu erwarten, weil bereits mit CCl_4-Dosierungen, die noch zu keinem der anderen Effekte führen, also auch nicht zu einem Kalziumeinstrom, eine Aktivitätsabnahme der Glukose-6-Phosphatase erzielt wird (Reynolds, 1965 b). Unsere Ergebsnisse zeigen demgegenüber, daß auch eine sekundäre Beeinträchtigung der Enzymschädigung durch Kalzium nicht gegeben ist.
Mikrosomen sind ähnlich wie Mitochondrien in der Lage Kalzium zu akkumulieren. Dieses Vermögen zur aktiven Anreicherung von Kalzium ist schon eine Stunde nach der CCl_4-Intoxikation deutlich vermindert (Moore, 1976). Carvalho (1963) zeigte, daß Mikrosomen Kalzium in Abhängigkeitvon der umgebenden Kalziumkonzentration bis zu einer Sättigungskonzentration von ca. 2 mM binden. Eine erhöhte Kalziumkonzentration scheint also durchaus auch auf mikrosomale Membranen zu wirken, umso bemerkenswerter ist es, daß dies offensichtlich keinen Einfluß auf die membrangebundenen Enzyme hat.

Behandlung	Kalziumgehalt		Cytochrom P-450		G-6-P'ase	Leucin-einbau
	Serum (mMol/l)	Leber (mMol/Kg)	Gesamthomogenat (mMol/g Leber)	Mikrosomen (mMol/mg Prot.)	(U/g Protein)	(dpm/mg Protein)
Na-gluk.	2,56±0,03	0,79±0,06	24,95±3,3	0,68±0,06	411,5±81,9	3585± 609
Ca-gluk.	6,92±0,91	1,58±0,50	26,26±1,9	0,71±0,07	364,7±91,6	3327± 632
Na-gluk. + CCl_4	2,50±0,09	4,58±1,18	14,94±0,8	0,44±0,03	169,8±20,8	1596± 240
Ca-gluk. + CCl_4	6,48±0,61	14,27±0,83	10,15±1,3	0,48±0,02	170,9±21,6	1089± 154

Tab. I: Auswirkungen der Applikation von Kalziumglukonat und CCl_4 auf den Kalziumgehalt in Serum und Leber, auf mikrosomale Enzyme und die Proteinsynthese. Die Tiere erhielten intraperitoneal CCl_4 und 10%iges Kalziumglukonat (jeweils 1 ml/Kg Körpergewicht) gleichzeitig eine Stunde vor der Entnahme von Blut und Leber. Vergleichstiere erhielten statt CCl_4 gleiche Mengen Olivenöl und statt Kalziumglukonat 10%iges Natriumglukonat. Jeder Wert stellt einen Mittelwert von 4 Tieren ± Standardabweichung dar.

Einfluß auf die Schädigung der Aminosäureinkorporation der Mikrosomen

Als eine der frühesten Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums nach CCl_4-Applikation beobachtet man elektronenmikroskopisch die Ablösung der Ribosomen von der Membranoberfläche schon nach 15 Minuten(Reynolds, 1963). Daneben findet man einen Verlust der regelmäßigen Anordnung der Ribosomen auch im Cytoplasma (Smuckler, 1976). Zur gleichen Zeit nimmt die Fähigkeit des rauhen endoplasmatischen Retikulums zur Proteinsynthese ab. Dies konnte sowohl in vivo als auch im zellfreien System gezeigt werden (Smuckler u. Benditt, 1965). Sich in ihren Ergebnissen gegenseitig ergänzend, führen mehrere Autoren (Richter, 1968; Farber,1971; Smuckler, 1976 b) diese Schädigung auf eine Veränderung des Ribosomen-Messenger-Komplexes zurück. Es konnte weiter gezeigt werden, daß sich nach CCl_4-Intoxikation das Sedimetationsverhalten der Ribosomen und der Polysomen ändert. Polysomen und 80S Ribosomen treten hierbei gegenüber 54S Untereinheiten vermindert auf (Richter, 1968; Smuckler, 1966). Smuckler sieht gerade hier einen möglichen Einfluß des veränderten Kalziumgehaltes nach CCl_4-Schädigung auf die Proteinbiosynthese. Er fand im Gegensatz zum ansonsten erhöhten Kalziumspiegel der Leber eine Stunde nach der Gabe von CCl_4 einen verminderten Kalziumgehalt der Polysomen,den er für die Dissoziation der Ribosomen verantwortlich macht. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtungen von Petermann (1964), der eine solche Dissoziation bei verminderter Magnesiumkonzentration aufzeigte und durch die Ergebnisse von Oberling (1956), der das zur Strukturerhaltung erforderliche Magnesium durch Kalzium ersetzen konnte.

In unseren Experimenten ergab sich in Übereinstimmung mit Smuckler(1966) eine Stunde nach der in vivo Applikation von CCl_4 eine um 50% verminderte Einbaurate von 1-^{14}C-Leucin im zellfreien System. Der Einbau des Leucins wurde um weitere 15% signifikant gehemmt, wenn gleichzeitig mit dem CCl_4 Kalziumglukonat injiziert wurde. Die alleinige Applikation von Kalziumglukonat hatte dagegen keinen Einfluß auf die Proteinsynthese (Tab. I), was bei dem nur wenig gegenüber der Norm erhöhten Kalziumgehalt auch nicht zu erwarten war (Smuckler, 1965/66).

Es stellt sich die Frage, ob die durch Kalziumglukonat bedingte zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese auf einer zusätzlichen Schädigung in vivo oder auf einer direkten Beeinträchtigung der Präparation bzw. des Leucineinbaus in vitro beruht. Schenkman (1972) zeigte, daß es bei sehr hohen Kalziumkonzentrationen zu einer Ablösung der Ribosomen von der mikrosomalen Membran kommt. Außerdem ist bekannt, daß Kalzium in hohen Konzentrationen zu einer Hemmung der Proteinsynthese im zellfreien System führt(Smuckler, 1965). Um solch präparative Einflüsse des Kalziums bei den gegebenen Konzentrationen aufdecken zu können, fügten wir dem Homogenisationsmedium Kalziumchlorid derart zu, daß sich im Leberhomogenat von Normaltieren und mit CCl_4 behandelten Tieren eine ca. 20-fach über der Norm liegende Kalziumkonzentration ergab (Tab. III). Dies entsprach der Kalziumkonzentration des Homogenates von gleichzeitig mit CCl_4 und Kalziumglukonat behandelten Tieren. Weder bei normalen Lebern, noch bei CCl_4-geschädigten Lebern war ein Einfluß dieser in vitro erhöhten Kalziumkonzentration auf den Leucineinbau feststellbar (Tab. III). Es kann also davon ausgegangen werden

daß die zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese nach in vivo erhöhtem Leberkalzium nicht auf durch Kalzium hervorgerufene Veränderungen der Präparationsbedingungen beruht.

Tab.III: Abhängigkeit des Leucineinbaus von der in vitro variierten Kalziumkonzentration des Leberhomogenates unbehandelter und CCl_4-geschädigter (1 ml/Kg; 1 h) Tiere. Die Lebern wurden nach Perfusion in Saccarose/Tris-Lösung oder in $CaCl_2$-haltiger Saccarose/Tris-Lösung (1,7 bzw. 2,2 mM an $CaCl_2$) homogenisiert. Nach Präparation der Mikrosomen wurde in vitro der Einbau von 1-^{14}C-Leucin in die mikrosomalen Proteine bestimmt. Mittelwerte von wenigstens drei Tieren ± Standardabweichung.

Behandlung	Homogenisations-medium	Kalzium Hom. (mMol/l)	Leucineinbau (%)
Normaltiere	Sacc./Tris	0,11	100 ± 2,1
Normaltiere	Sacc./Tris (2,2 mM Ca)	2,06	102 ± 5,9
CCl_4	Sacc./Tris	0,50	42 ± 2,5
CCl_4	Sacc./Tris (1,7 mM Ca)	2,04	43 ± 7,5

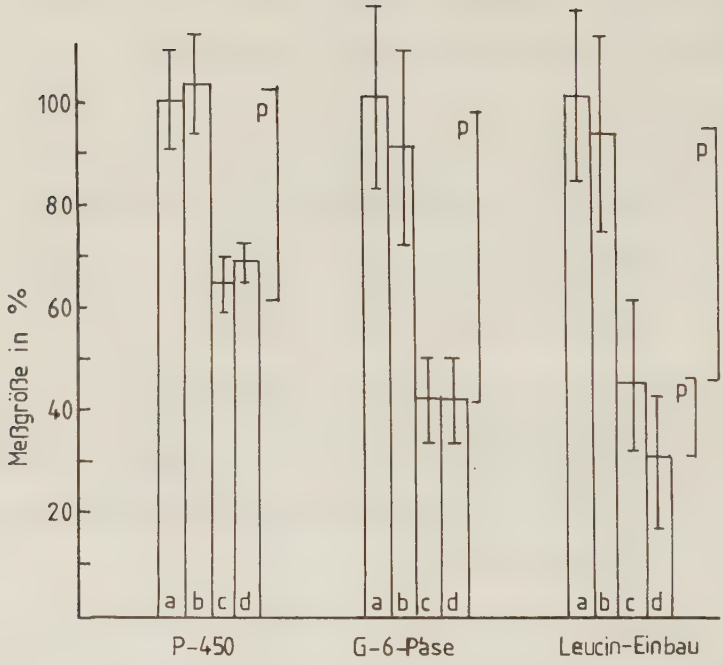

Abb. 7 Darstellung des Einflusses von in vivo appliziertem Kalziumglukonat auf die Konzentration von Cytochrom P-450, die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase und des in vitro Einbaus von 1-^{14}C-Leucin bei Normaltieren und CCl_4-geschädigten Tieren. a: Normaltiere, b: mit 1o%igem Kalziumglukonat (1 ml/Kg; 1 h) behandelte Tiere, c: mit CCl_4 (1 ml/Kg; 1 h) behandelte Tiere, d: mit CCl_4 und Kalziumglukonat behandelte Tiere. Die Meßwerte wurden auf die bei Normaltieren gemessenen Werte (100%) bezogen. Die prozentuale Streuung ist angegeben. p: signifikant mit $p < 0,05$.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Verlauf einer experimentellen Leberschädigung der Ratte durch CCl_4 wurde der Einfluß eines erhöhten intrahepatischen Kalziumgehaltes auf die Effekte der Vergiftung eine Stunde nach in vivo Applikation des Giftes untersucht. Folgende Befunde wurden erhoben:

1. Mit der in dieser Arbeit erarbeiteten Methode ließ sich an ein und demselben Tier sowohl die Kalziumkonzentration in Leber und Serum als auch die Konzentration von Cytochrom P-450 bestimmen.

2. In der Leber ist die Kalziumkonzentration 1 bis 2 Stunden nach der intraperitonealen Applikation von 1 ml CCl_4/Kg Körpergewicht in Übereinstimmung mit der Literatur 4-bis 5-fach erhöht und nach 3 Stunden bereits wieder im Normalbereich.
Diese Konzentrationserhöhung läßt sich durch Steigerung der CCl_4-Dosis auf 2,5 ml/Kg nicht beeinflussen, wogegen der intrahepatische Kalziumgehalt durch zusätzliche Applikation von Kalziumglukonat nach einer Stunde bis zum 20-fachen der Ausgangskonzentration ansteigt.

3. Intraperitoneal appliziertes Kalziumglukonat bewirkt innerhalb von Minuten einen 3-fach erhöhten Kalziumgehalt des Serums. Dieser erhöhte Wert, wie auch der von Normaltieren, erwies sich unabhängig von der CCl_4-Behandlung über den Untersuchungszeitraum von einer Stunde als konstant.

4. Der durch Kalziumglukonat erhöhte intrahepatische Kalziumgehalt hat weder schützende noch zusätzlich schädigende Wirkungen auf die CCl_4-abhängige Konzentrationsabnahme des Cytochrom P-450

in den Mikrosomen.Dies legt nahe, daß der schützende Effekt von Vitamin D nicht auf die erhöhte Kalziumkonzentration in der Leber zurückzuführen ist.

5. Die erhöhte intrahepatische Kalziumkonzentration hat keinen Einfluß auf die Schädigung der Glukose-6-Phosphatase.

6. Die erhöhte Kalziumkonzentration hat keinen Schutzeffekt auf die CCl_4-bedingte mikrosomale Proteinsynthesehemmung. Der durch CCl_4-Intoxikation um 50% verminderte in vitro Einbau von Leucin wird bei erhöhtem Leberkalzium sogar um weitere 15 % gehemmt. Dieser Effekt ist nicht auf die veränderten präparativen Bedingungen zurückzuführen, da er sich durch entsprechende Erhöhung des Kalziums im Leberhomogenat nicht nachvollziehen ließ.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Baginski, E.S., Foa,P.P. und Zak,B. (1974)
in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.)
Verlag Chemie, Weinheim

Barker,E.A.,Arcasoy,M. und Smuckler,E.A. (1969)
Agents Actions 1 27-34

Burck,H.C. (1961)
Klin.Wschr. 39 751-754

Cameron,G.R. und Karunaratne,W.A.E. (1936)
J. Path. Bact. 42 1-21

Cantarow,A.,Stewart,H.L. und Morgan,D.R. (1938)
J. Pharmacol. and Exp. Therap. 63 153-172

Carvalho,A.P.,Sanui,H. und Pace,N. (1963)
J. Cell. Comp. Physiol. 62 311-317

Castro,J.A.,Cignoli,E.V.,de Castro,C.R. und de Fenos,O.H.(1972)
Biochem. Pharmacol. 21 49-57

De Groot,H. (1979)
Universität Düsseldorf,Diplomarbeit

Farber,E. (1971)
Biochem.Pharmacol. 20 1023-1026

Fander,U. (1979)
Universität Düsseldorf,Dissertation

Gerhard,H.,Schultze,B. und Maurer,W. (1970)
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6 38-56

Greenway,C.V. und Stark,R.D. (1971)
Physiol. Rev. 51 23-65

Haas,W. (1979)
Universität Düsseldorf, unveröffentlichte Ergebnisse

Judah,J.D.,Ahmed,K. und Mc Lean,A.E.M. (1964)
in Cellular Injury, Ciba Foundation Symposium
(De Reuck,A.V.S. und Knight,J. eds.) Churchill L.T.D.,London

Kamath,S.A.,Kummerow,F.A. und Narayan,K.A. (1971)
FEBS Letters 17 90-92

Kamath,S.A. und Narayan,K.A. (1972)
Anal. Biochem. 48 53-59

Kröner,H. und Planker,M. (1977)
Beitr. Path. 160 245-259

Lowry,O.H.,Rosebrogh ,N.J.,Farr,A.L. und Randall,R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193 265-275

Majno,G. (1964)
in Cellular Injury, Ciba Foundation Symposium
(De Reuck,A.V.S. und Knight,J. eds.) Churchill L.T.D.,London

Manery,J.F. (1969)
in Mineral Metabolism III (Comar,C.L. und Bronner,F. eds.)
Academic Press,New York

Minot,A.S. und Cutler,J.T. (1929)
J.Clin.Invest. 6 369-402

Moore,L.,Davenport,G.R. und Landon,E.J. (1976)
J.Biol.Chem. 25 Pt4 1197-1201

Oberling,C. und Rouiller,C. (1956)
Ann. Anat. Path. 1 401-412

Omura,T. und Sato,R. (1964)
J. Biol. Chem. 239 2370-2378

Petermann,M.L.(1964)
The physical and chemical properties of ribosomes
Elsevier Publishing Company,New York

Recknagel,R.O. (1967)
Pharmacol.Rev. 19 No.2 145-208

Recknagel,R.O. und Glende,E.A. (1973)
Crit. Rev. Toxicol. 2 263-297

Rees,K.R. (1962)
in Cellular Injury, Ciba Foundation Symposium
(De Reuck und Mongar eds.) Churchill L.T.D.,London

Reynolds,E.S.,Thiers,R.E. und Vallee,B.L. (1962)
J.Biol.Chem. 237 3546-3551

Reynolds,E.S. (1963)
J. Cell. Biol. 19 139-157

Reynolds,E.S. (1964)
Lab. Invest. 13 1457-1470

Reynolds,E.S. (1965 a)
J. Cell. Biol. 25 53-75

Reynolds,E.S. (1965 b)
Fedn.Proc.Amer.Socs.Exp.Biol. 24 166

Reynolds,E.S.,Ree,H.J. und Moslem,M.T. (1972)
Lab.Invest. 26 290-299

Richter,G. und Michel,S. (1965)
Acta biol. med. german. 15 667-679

Richter,G.,Michel,S. und Rupprecht,H. (1968)
Acta. biol. med. german. 21 595-602

Schenkman,J.B. und Cinti,D.L. (1972)
Life Sciences 11 PtII 247-257

Schenkman,J.B. und Cinti,D.L. (1978)
in:Methods of Enzymology 52 Pt.C 83-89
(Fleischer,S. und Packer,L. eds.) Acad. Press,New York

Slater,T.F. und Sawyer,B.C. (1969)
Biochem. J. 111 317-324

Smuckler,E.A.,Iseri,O.A. und Benditt,E.P. (1961)
Biochem. biophys. Res. commun. 5 270-275

Smuckler,E.A. (1965)
Fedn. Proc. Fedn. Amer. Socs. Exp. Biol. 24 556

Smuckler,E.A. und Benditt,E.P. (1965)
Lab. Invest. 14 1699-1709

Smuckler,E.A. (1966)
Lab. Invest. 15 157-166

Smuckler,E.A.,Arrhenius,E. und Hultin,T. (1967)
Biochem. J. 103 55-64

Smuckler,E.A.,Pathier,B. und Hultin,T. (1968)
Biochem. J. 107 151-161

Smuckler,E.A. (1976)
Environment Health Perspectives 15 13-25

Smuckler,E.A. (1976 b)
Pan.Med. 18 292-309

Wells, H.G. (1925)
Chemical Pathology ed. 5 W.B. Saunders, Philadelphia

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. S. Hollmann für die Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. H. Kröner danke ich für die Vermittlung methodischer Kenntnisse.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. W. Haas für zahlreiche wertvolle Anregungen, sowie für seine große Mühe bei der Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken.

L E B E N S L A U F

Ich, Friedhelm Reuter, wurde am 1. Februar 1954 als Sohn des Bäckermeisters Friedrich Reuter und der Lieselotte Reuter in Düsseldorf geboren. Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Städtische Volksschule an der Helmholtzstraße in Düsseldorf, um dann auf das Städtische-Lessing-Gymnasium zu wechseln, wo ich im Mai 1972 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1973 nahm ich an der Ruhr-Universität-Bochum das Studium der Wirtschaftswissenschaften auf. Zum Wintersemester 1974 begann ich an der Universität Düsseldorf mit dem Studium der Medizin. Hier bestand ich im Februar 1980 das Promotionskolloquium über die vorgelegte Arbeit und legte im März 1980 die zweite ärztliche Prüfung ab.